

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平5-339166

(43)公開日 平成5年(1993)12月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/18	A B U	8314-4C		
A 2 3 L 1/305				
A 6 1 K 37/64	A E Q	8314-4C		
C 0 7 K 15/10		8619-4H		
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数2(全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-168467	(71)出願人	591043400 阿保 定吉 青森県青森市大字浜田字玉川224番地
(22)出願日	平成4年(1992)6月3日	(72)発明者	工藤 重光 青森県青森市大字浜田字玉川202番地 か ねさ株式会社内
		(72)発明者	大久保 一良 宮城県仙台市泉区南中山3丁目18-15
		(74)代理人	弁理士 新関 和郎

(54)【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害物質およびその製造法

(57)【要約】

【目的】 アンジオテンシン変換酵素を有効に阻害することにより、血圧上昇を抑制する安全な物質を、食品素材の中からみいだし、その阻害物質の構造を明らかにするとともに、簡単な濃縮法を開発し、アンジオテンシン変換酵素阻害物質を含む食品素材を提供する。

【構成】 大豆蛋白質溶液を蛋白質加水分解酵素で分解後、直ちに逆相分配系樹脂に吸着し、含水アルコールで溶出してアンジオテンシン変換酵素阻害物質を製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】構造式Pro-Ala-Gly-Tyr, Pro-Arg-Val-Ph
e, Leu-Glu-Phe, Asp-Thr-Lys-Phe, Tyr-Pro-Ser およびPh
e-Tyr に示されるペプチドおよびその塩を少なくとも一種を含有することを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害物質。

【請求項2】大豆蛋白質溶液を蛋白質加水分解酵素で分解後、直ちに逆相分配系樹脂に吸着し、含水アルコールで溶出することを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害物質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへの変換を触媒するアンジオテンシン変換酵素の阻害物質およびその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】最近、アンジオテンシン変換酵素の阻害剤が、本態性高血圧に効果的であることが多くの研究および臨床の場で明らかにされている。即ち、アンジオテンシン変換酵素は、昇圧に働く内分泌・体内性因子として代表的なレニン・アンジオテンシン系で重要な役割を担っているとともに降圧に働く内分泌系・体内性因子として代表的なカリクレイン・キニン系に大きく関与している。さらに、レニン・アンジオテンシン系では、腎臓の酵素レニンが血中に分泌され、血中の糖蛋白質アンジオテンシンノーゲンに作用し、アンジオテンシンIを生成する。この物質には昇圧作用はないがこれにアンジオテンシン変換酵素が作用するとこの系の生物活性の中心であるアンジオテンシンIIは抹消血管を収縮させ抹消血管抵抗を増大させるとともに副腎皮質に作用してアルドステロンの産生遊出を促進する。アルドステロンは腎臓に作用し、ナトリウムの再吸収を促進し、体内に水とともに貯留するため体液量が増え、心拍量が増大する。これらの作用は血圧を大きく上昇させる。このように、アンジオテンシン変換酵素の生理的作用機序が明らかとなり、アンジオテンシン変換酵素阻害物質による高血圧に対する有効性が確かめられている。

【0003】このような理論的裏付けから、天然物からのアンジオテンシン変換酵素阻害物質の検索が行なわれ、多數見出されている。さらに、より効果的阻害剤の合成が行なわれている。一方、日常摂取されている食品からもアンジオテンシン変換酵素阻害物質が見いだされており、合成阻害剤と比べ、これらは、長年にわたる食経験からその安全性が充分確かめられていることから、平常の食生活により血圧を正常に保つ効果が期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、天然物および食品由来アンジオテンシンI変換酵素阻害物質

は、人体に対する安全性から需要性が高く、より一層の開発が望まれていた。

【0005】本発明は、この課題を解決するためになされたものであって、アンジオテンシン変換酵素を有効に阻害することにより、血圧上昇を抑制する安全な物質を、食品素材の中からみいだし、その阻害物質の構造を明らかにするとともに、簡単な濃縮法を開発し、アンジオテンシン変換酵素阻害物質を含む食品素材を提供することを目的とする。

10 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、上述の目的のために種々の研究を重ねて得られた知見に基づいて完成したものである。

【0007】即ち、広範囲の食品に使用されている大豆を原料として、その水抽出液を調製し、蛋白質分解酵素により分解し、その不溶物を遠心および汎過により取り除き、そのろ液を直ちに逆相充填剤を詰めたカラムに流し、アンジオテンシン変換酵素阻害物質を吸着後、含水アルコールで溶出することにより、簡単に阻害物質を濃縮することができ、また、この阻害物質混合物から構造式Pro-Ala-Gly-Tyr, Pro-Arg-Val-Phe, Leu-Glu-Phe, Asp-Thr-Lys-Phe, Tyr-Pro-Ser およびPhe-Tyrの6種のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを単離することができたことによるものである。

【0008】そして、このことから、本発明においては、上述の目的を達成するための手段として、構造式Pro-Ala-Gly-Tyr, Pro-Arg-Val-Phe, Leu-Glu-Phe, Asp-Thr-Lys-Phe, Tyr-Pro-Ser およびPhe-Tyr に示されるペプチドおよびその塩を少なくとも一種を含有することを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害物質を提起し、また、大豆蛋白質溶液を蛋白質加水分解酵素で分解後、直ちに逆相分配系樹脂に吸着し、含水アルコールで溶出することを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害物質の製造法を提起するものである。

【0009】

【実施例】次に本発明の実施例を具体的に説明する。

(実施例1)豆乳2リットルに1gの蛋白質分解酵素を添加し、緩やかに攪拌しながら45°Cで2時間加水分解を行なった。次に、反応容器をそのまま沸騰水中につけ加熱を続けることにより、熱凝固性蛋白質を凝集し、遠心分離により、上清を得た。さらにセライト汎過により透明液を得ることができた。この液を凍結乾燥することにより、凍結乾燥物80.84gを得ることができた。また、アンジオテンシン変換酵素阻害活性は、IC₅₀ 125μg/mlであった。なお、ここで汎過液を凍結乾燥したのは、IC₅₀を測定するためであり、凍結乾燥を行なわずに次の工程にいくことができる。

【0010】凍結乾燥物80gを400mlの水に溶解後、逆相分配系樹脂を充填し、予め水で平衡化したカラム(5×50cm)に供給し、1リットルの水で溶出した後、順次1

0%づつメタノール濃度を上げ、50%メタノールまでステップワイズで溶出を行なった。ここで用いた逆相分配系樹脂は、オクタデシルシラン（株式会社ワイエムシー）を用いたが、いずれの逆相分配樹脂でも使用できる。また、溶出メタノールを用いたがこれにかぎるものではない。最後に、100%メタノールで溶出後、各溶出画分を濃縮・凍結乾燥し、収量とアンジオテンシン変換酵素阻害活性を測定した。その結果（表1）100%水溶出画分、即ち、非吸着成分に阻害活性は、検出されなかつた。また、10~100%メタノール溶出画分全てに同程度の活性が検出されることから、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドは、逆相分配系充填カラムに吸着する性質を有し、しかも、多数存在するものと推定された。また、この結果から明らかなように一回の操作によりアンジオテンシン変換酵素阻害活性の高い物質を高収量で得ることができる。

【0011】逆相分配系充填カラムに吸着したアンジオテンシン変換酵素阻害物質の有効性を確かめるために、高血圧自然発症ラット（SHR）を用い調べた。即ち、窒素源としてカゼイン、分離大豆蛋白および豆乳を上記のように処理し、逆相分配系樹脂を充填したカラムにかけ非吸着成分の溶出後、100%メタノールで溶出し、この100%メタノール溶出画分を凍結乾燥し粉末状にしたもの用い、合成実験飼料を作成し、SHRに投与した。なお、その時の飼料組成は、表2の通りであった。この飼料を飲水とともに自由に摂取させた。血圧は、無麻酔下、非絶食下で尾静脈圧を測定した。その結果、図1に示すように100%メタノール溶出画分に血圧上昇抑制効果が認められた。

【0012】（実施例2）実施例1に示したように、アンジオテンシン変換酵素阻害物質混合物が実際にSHRの血圧上昇抑制作用を示すことから、その活性本体の単離精製を行なった。即ち、実施例1における20%メタノール溶出画分2.77gを15%メタノールに溶解し、予め同じ溶媒で平衡化したオクタデシルシリルカラム（2.5×22cm）に供給し、同じ溶媒で溶出した。各画分の220nmにおける吸光度を測定した結果（図2）、No.93にピークを示した。また、各フラクション100μlを使用し、阻害活性を測定した結果、No.93ピーク成分の比活性、阻害活性を測定した結果、No.93ピーク成分の比活性

$$\{1 - (OD_a - OD_{ab}) / (OD_c - OD_{cb})\} \times 100$$

（但し、OD_aは上記のようにしてサンプルを加えて測定した時の吸光度、OD_{ab}は混合液を反応する前に1規定の塩酸を0.25ml添加し測定した時の吸光度、OD_cは混合液にサンプルを加えずに測定した時の吸光度、OD_{cb}は混合液にサンプルを加えずに1規定の塩酸を0.5ml添加して測定した時の吸光度）またアンジオテンシン変換酵素阻害率が50%になるのに必要な阻害物質の濃度をIC₅₀と定義し阻害活性の強さの指標とした。

【0016】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、※50

*性が低いと考えられることから、No.35から80およびNo.110から160を濃縮・凍結乾燥し、それぞれ20Iおよび20II画分とした。また、各画分のIC₅₀は、20Iが50μg/ml、20IIが40μg/mlであった。

【0013】続いて、20II画分をバイオゲルP-2（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社）によるゲル沪過を行なった。即ち、20II画分0.33gを蒸留水に溶解し、蒸留水で平衡化してあるバイオゲルP-2カラム（2×91cm）でゲル沪過を行なった。活性ピークNo.45-53.54-63および64-85（図3）をそれぞれ濃縮・凍結乾燥し20II-1、20II-2、20II-3とした。各画分のIC₅₀は、それぞれ93.5および3μg/mlであった。

【0014】YMC-ODS AM323カラム（株式会社ワイエムシー）を用い、20II-2および20II-3画分から活性成分の単離を高速液体クロマトグラフィーで行なった。その結果（図4および図5）、20II-2画分から20II-21、22、23および24の4成分を分離することができ、また、20II-3画分から20II-31および20II-32の2成分を分離することができた。また、単離した各成分のIC₅₀および構造解析の結果を表3に示した。

【0015】なお、この実施例におけるアンジオテンシン変換酵素阻害率の測定は、公知のアンジオテンシン変換酵素阻害活性測定法（Cushman-Cheung法）によって測定した。即ち、1単位のアンジオテンシン変換酵素（シグマ社、ラビット肺由来）を20mlの0.1Mホウ酸緩衝液（pH8.3、0.3M NaClを含む）に溶解し、アンジオテンシン変換酵素溶液を調製した。この酵素液0.15mlに阻害剤溶液0.1mlを加え、さらに、100mgのヒプリルーヒスチジルロイシン（Hippuryl-His-Leu、シグマ社）を50mlのホウ酸緩衝液（pH8.3、0.3M NaClを含む）に溶解して調製した基質溶液0.25mlを加え混合した。次に、この混合溶液を、37°Cで30分間反応した後、1規定の塩酸を0.25ml添加し反応を停止した。その後1.5mlの酢酸エチルを加えて充分攪拌し、3,000rpmで2分間遠心分離後、酢酸エチル層を1ml採取した。この酢酸エチルを蒸発乾固後、1mlの蒸留水に溶解し、抽出したヒプリル酸の吸収（228nm）を測定し、アンジオテンシン変換酵素阻害率を下記の式により求めた。

$$\{1 - (OD_a - OD_{ab}) / (OD_c - OD_{cb})\} \times 100$$

※高血圧の予防に効果的であることが臨床の場で明らかにされているアンジオテンシン変換酵素阻害物質を、副作用などの面で心配のある合成阻害剤としてではなく、長い食体験からその安全性が立証されている食品である大豆を用い、その蛋白質分解酵素により生成するアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを逆相分配系カラムに吸着後、含水アルコールで溶出することにより、濃縮した形態として得られるようになっているのだから、平常の食生活により血圧を正常に保つ効果のある安全な食品素材を、簡単な操作で濃縮して得られるようになる。また、

単離したアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドは、阻害率が高く食品素材としてばかりではなく医薬品として活用できるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】カゼイン、分離大豆蛋白および逆相分配系樹脂に吸着した成分の自然発症高血圧にラットに対する血圧抑制を示す図である。

【図2】オクタデシルシリルカラム（株式会社ワイエムシー）による逆相分配クロマトグラフィーで分画した各フラクションの220nmにおける吸光度およびアンジオテンシン変換酵素阻害率を示した図である。 10

【図3】ゲル済過（バイオゲルP-2）によって分画された各フラクションの220nmにおける吸光度およびアンジオテンシン変換酵素阻害率を示した図である。

【図4】高速液体クロマトグラフィーを用いて分画を行なった時の吸光度を表す図である。

【図5】高速液体クロマトグラフィーを用いて分画を行なった時の吸光度を表す図である。

【表1】

各含水メタノール溶出画分の
アンジオテンシン変換酵素阻害活性

メタノール濃度 (%)	収量 (g)	IC ₅₀ (μg/ml)
0	43.01	—*
10	4.49	92
20	2.77	65
30	2.47	80
40	1.94	62
50	1.28	86
100	0.71	100

【表2】

実験飼料組成

窒素源	20.0%
コーン油	5.2
ビタミン混合液 (ハーバー)	1.0
ミネラル混合液 (ハーバー)	4.0
塩化コリン	0.2
セルロースパウダー	2.0
シュークロース	35.15
α-スターチ	0.2

【表3】

20

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

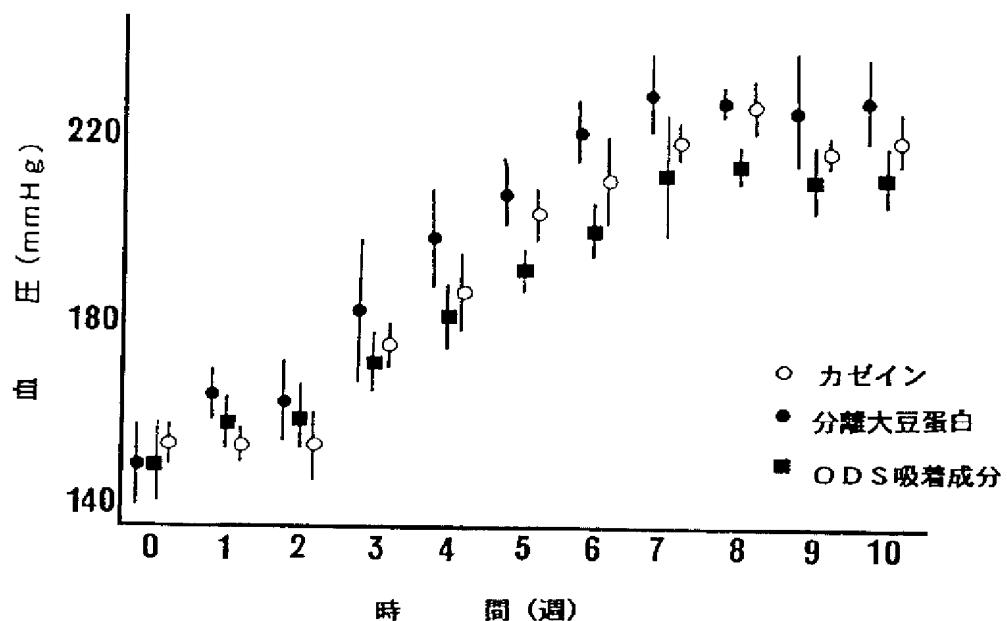
30

30</

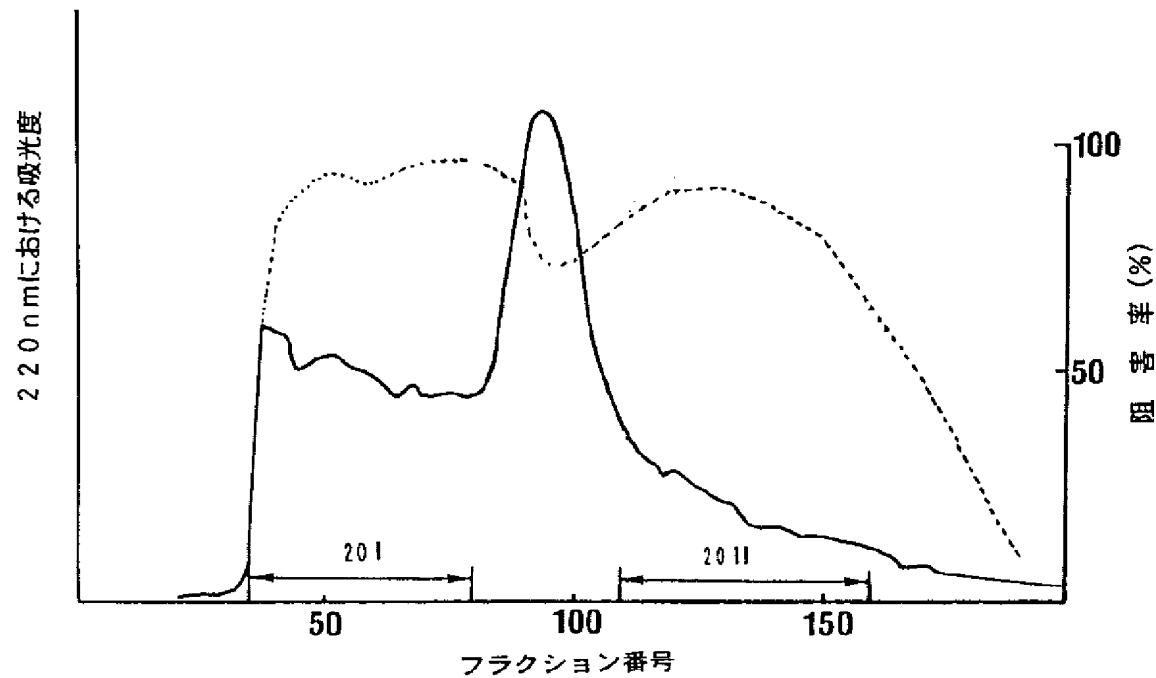
単離したアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドの
 IC_{50} とアミノ酸配列

	IC_{50} (μM)	アミノ酸配列	FAB-MS
20 II-21	25	Pro-Ala-Gly-Tyr	407 [M+H] ⁺
20 II-22	40	Pro-Arg-Val-Phe	518 [M+H] ⁺
20 II-23	15	Leu-Glu-Phe	392 [M+H] ⁺
20 II-24	30	Asp-Thr-Lys-Phe	510 [M+H] ⁺
20 II-31	77	Tyr-Pro-Ser	366 [M+H] ⁺
20 II-32	23	Phe-Tyr	329 [M+H] ⁺

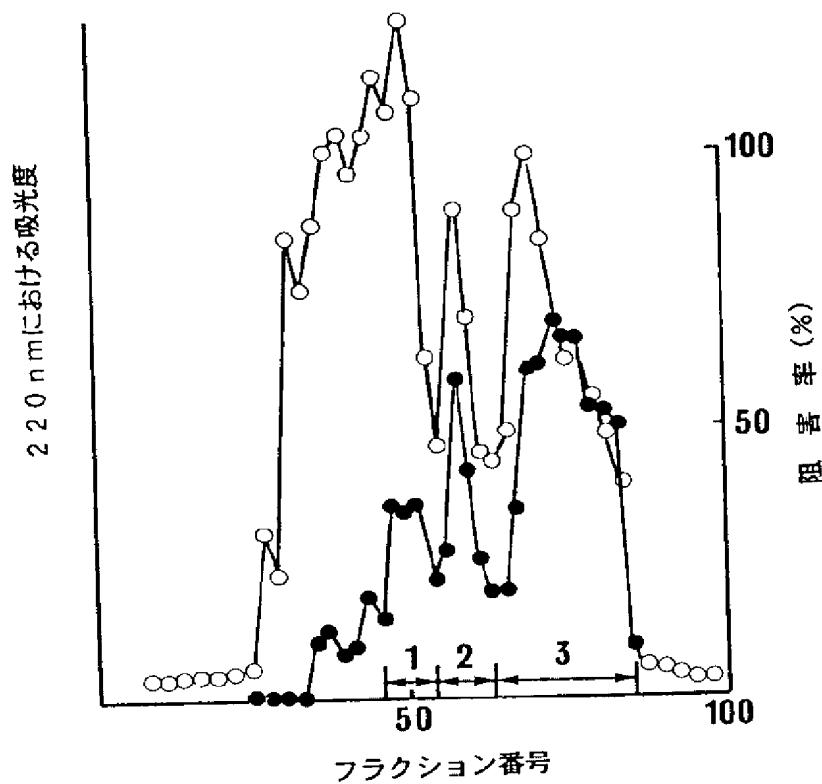
【図1】



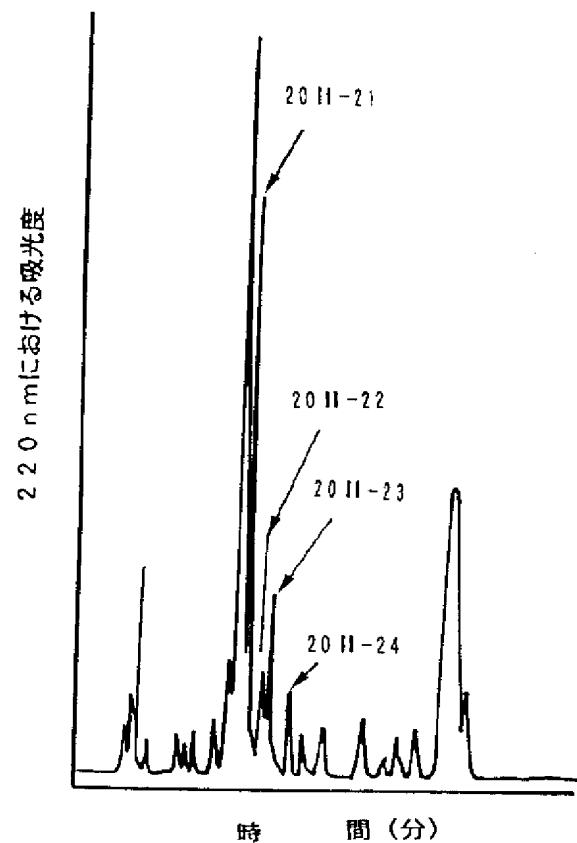
【図2】



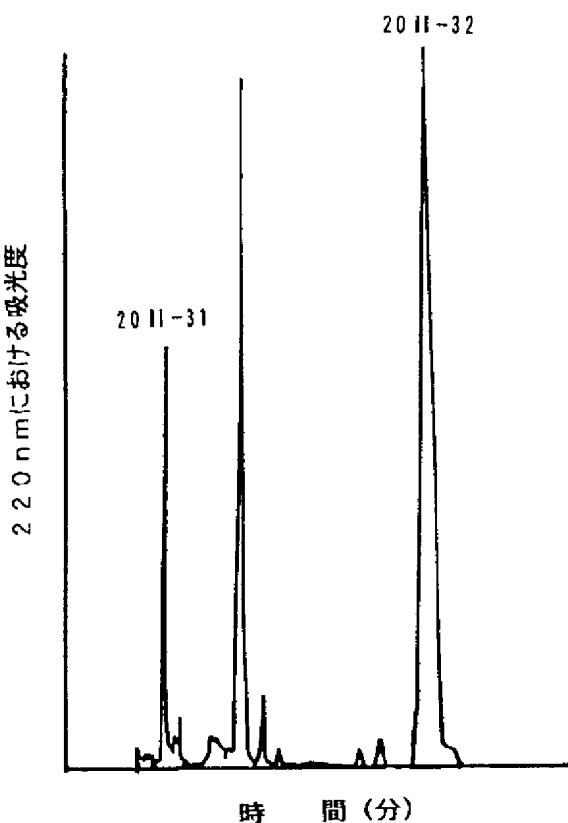
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

C 12 P 21/06

識別記号

Z N A

府内整理番号

8214-4B

F I

技術表示箇所